

[文章编号] 1007-385X(2005)04-0309-03

以端粒酶逆转录酶为靶点的肿瘤免疫治疗

林晓燕 综述; 张叔人 审阅(中国医学科学院, 中国协和医科大学肿瘤医院肿瘤研究所免疫室, 北京 100021)

[摘要] 端粒酶是迄今已知最广泛的肿瘤标志物, 根据反向免疫学和免疫学实验验证的端粒酶催化亚单位(hTERT)抗原肽与限制性的 HLA 结合后, 可诱导特异性的 CTL 生成, 杀伤 MHC 限制性的 hTERT⁺ 肿瘤细胞。体内实验证明靶向 hTERT 的肿瘤免疫治疗不会对正常器官产生明显的毒副作用, 具有很好的应用前景。

[关键词] 端粒酶; 肿瘤免疫治疗

[中图分类号] R730 **[文献标识码]** A

二十世纪 30 年代, 有学者发现真核细胞染色体末端有一种能维持染色体结构稳定的特殊结构——端粒(telomere, TLM)^[1]。端粒酶是存在于干细胞、精原细胞和绝大多数恶性肿瘤细胞中的一种能延长端粒 DNA 的逆转录酶, 由 RNA 成分(human telomerase RNA, hTR)、催化亚单位(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)和端粒酶相关蛋白 1(telomerase associated protein, TP1)三个亚单位组成。根据目前已经检测出的肿瘤组织标本的统计学分析, 恶性肿瘤组织端粒酶活性的阳性率达到 84%~95%, 而良性肿瘤和正常组织的端粒酶活性检出率仅为 4%左右, 因此端粒酶有可能作为治疗肿瘤的靶点。从理论上讲针对端粒酶的治疗比单纯针对某个癌基因或抑癌基因的治疗具有更为广阔的应用前景, 为肿瘤治疗提供了新的思路^[2]。

目前, 国内外提出的以端粒酶为靶点的肿瘤治疗途径主要有: 抑制端粒酶的活性; 利用端粒酶启动子构建自杀基因载体; 利用 hTERT 作为免疫原用于免疫治疗。研究表明虽然端粒酶抑制剂可以抑制端粒酶活性, 但肿瘤细胞并不立即停止生长, 使端粒缩短达到凋亡需要较长时间。而利用 hTERT 作为免疫原激发机体的抗肿瘤免疫反应作用较快, 具有很好的应用前景, 目前这方面的研究已经进入了 II 期临床实验。

1 hTERT 抗原肽的发现

1999 年 Vonderheid 等^[3]发现来源于 hTERT 的九肽与 MHC-I 类分子结合呈递在肿瘤细胞表面, 激活特异性的细胞毒性 T 细胞(CTL)导致肿瘤细胞溶解, 因而初步认为 hTERT 是一种可被 CTL 特异识别的广泛表达的肿瘤相关抗原, 从而开创了以端粒酶逆转录酶为靶点的肿瘤免疫治疗。

研究证明 hTERT 可以通过 MHC-I 和 MHC-II 类分子途径进行提呈。已经筛选出了 MHC-I 类分子等位基因 HLA-A2, HLA-A3, HLA-A24, HLA-A1 限制的肽段^[3-7]。这些肽段大都是利用反向免疫学的方法, 即根据 MHC 和抗原肽结合的规律, 对可能的肿瘤抗原蛋白序列进行电脑筛选, 再经过

一系列免疫学实验进行验证。第一个被筛选出的抗原肽是 MHC-I 类分子等位基因 HLA-A2 限制的抗原肽 I540, 实验表明 I540 与 HLA-A2 分子紧密结合, 可诱导约 70% 的 HLA-A2 人群产生 CTL^[3]。表 1 列出了不同 HLA 表型结合的 hTERT 抗原肽, 及其 CTL 杀伤的肿瘤细胞株。

CD4⁺T 淋巴细胞在免疫应答过程中处于中心地位, 分泌多种细胞因子影响细胞毒 T 淋巴细胞、巨噬细胞、B 淋巴细胞的活化、分化。CD4⁺淋巴细胞对于诱导和维持体内的抗肿瘤反应非常重要。但 MHC-I 类限制性抗原肽不能激发 CD4⁺T 细胞, Schroers 等^[8,9]发现了 HLA-DR7 限制性抗原肽 I672, I766, 这些抗原肽可通过 MHC-II 途径被加工提呈, 有效激发特异的 CD4⁺T 细胞。

2 hTERT 抗原肽诱导的抗肿瘤效应

hTERT 抗原肽与限制性的 HLA 结合后可诱导特异性的 CTL 生成, 杀伤 MHC 限制性的 hTERT⁺ 肿瘤细胞, 研究最多的 hTERT 抗原肽是 I540, 目前已经进入临床 I 期实验。在体外利用 HLA-A2 与 I540 肽构成的四聚体复合物可以检测到约 1%~3% 的特异的 CD8⁺ 细胞, 与从肿瘤患者和正常人体中诱导的 hTERT 特异的 CTL 水平相当^[10]。将 hTERT 全长 DNA 转染端粒酶阴性的肉瘤细胞株 U2OS 使之变成 hTERT⁺ 细胞, 该细胞可以被 I540 肽激活的 CTL 裂解, 用单克隆抗体封闭 HLA-A2 后, 裂解作用消失, 证明该 CTL 作用是 hTERT 特异性的^[3]。将前列腺癌或肾癌细胞总 RNA 转入自体的树突状细胞, 也可在体内或外激发与 hTERT 相关的特异性 CTL 反应^[11]。

小鼠体内实验也验证了 hTERT 作为免疫原进行免疫治疗的可行性, 转染了 mTERT RNA 的树突细胞激发的 TERT 特异性 CTL 反应可以抑制鼠移植瘤的生长, 降低黑素瘤细胞对肺的转移^[12]。临床 I 期实验证明利用自体 DC 细胞负载 I540 可以在患者体内激发产生特异 CTL 反应^[13]。但也有研究报道 I540 不能杀伤 hTERT⁺ HLA-A2 限制性表达的肿瘤细胞, 推测该肽段在蛋白酶体中被剪切掉, 故不能提呈到肿瘤

细胞表面引起特异性的杀伤^[14]。对此目前没有充分的解释,有待于进一步研究。

为了激发特异的 CD4⁺ T 细胞, Su 等^[15] 利用转染了 hTERT mRNA 的树突细胞免疫已发生转移的前列腺癌病人, 结果证明可以产生特异的 CTL。溶酶体相关膜蛋白(LAMP-1)带有内体/溶酶体分类信号,使表达的蛋白进入溶酶体,

LAMP-1 与 hTERT 融合可以增强 hTERT 被 MHC-II 分子加工呈递。将编码 hTERT/LAMP-1 蛋白的 mRNA 的导入树突细胞进行免疫,结果表明可以增强特异的 CD4⁺ T 细胞反应,同时不影响 MHC-I 表位的产生和提呈,提高 CTL 介导的特异杀伤能力^[15]。

表 1 端粒酶特异的 CTL 细胞杀伤总结

hTERT 免疫原性多肽	HLA-I 类分子类型	被裂解的 hTERT ⁺ , MHC-I 相匹配的细胞株
³²⁴ VYAETKHFL ³³²	A24	白血病细胞株(KH88, MEG01, OUN-1)
⁴⁶¹ VYGFVRACL ⁴⁶⁹	A24	白血病细胞株(KH88, MEG01, OUN-1)
⁵⁴⁰ ILAKFLHWL ⁵⁴⁸	A2. 1	卵巢癌细胞株(36M), 骨髓瘤细胞株(U266, IM9), 黑色素瘤细胞株(K029), 转染 hTERT 的 U2OS, CD40 激活的 B 细胞
⁵⁴⁰ ILAKFLHWL ⁵⁴⁸	A2. 1	乳腺癌细胞株(MCF-7), 结肠癌细胞株(SW480), 肺癌细胞株(H69), 黑色素瘤细胞株(624), 前列腺癌细胞株(Lncap)
⁵⁴⁰ ILAKFLHWL ⁵⁴⁸	A2. 1	p540 负载的黑色素瘤(K029, Me290, NA8-MEL)和结肠癌(SW480)
⁵⁴⁰ ILAKFLHWL ⁵⁴⁸	A2. 1	骨髓瘤细胞株(U266, IM9), 黑色素瘤细胞株(K029), hTERT 转染的 U2OS
⁵⁷² YLFFYRKSV ⁵⁸⁰	A2. 1	骨髓瘤细胞株(U266), HLA A2.1 转基因的宫颈癌 HeLa 和鼠源白血病细胞株(EL4, RMA)
⁸⁶⁵ RLVDFFLLV ⁸⁷³	A2. 1	乳腺癌细胞株(MCF-7), 结肠癌细胞株(SW480), 肺癌细胞株(H69), 黑色素瘤细胞株(624), 前列腺癌细胞株(Lncap)
⁹⁷³ KLFGLRLK ⁹⁸¹	A3	骨髓瘤细胞株(U266), 肺癌细胞株(SK-MES-1), 黑色素瘤细胞株(SK-MEL-2), CD40 激活的 B 细胞
³²⁵ YAETKHFLY ³³³	A1	白血病细胞株(HL60), 黑色素瘤细胞株(AKR, JKO) hTERT 载体 A2 结肠癌细胞株(SW403), 黑色素瘤细胞株(MEL624), 骨髓瘤细胞株(143B, hTERT 转染的 U2OS)

3 以 hTERT 为免疫原治疗肿瘤的安全性

虽然心脏、肺、肾脏、肝脏以及大脑中不表达 hTERT, 但造血干细胞、激活的淋巴细胞, 生殖细胞以及一些表皮细胞存在 hTERT 的表达, 理论上这将导致一些自体免疫反应和免疫耐受。然而实验证明: 尽管上述正常细胞表达有 MHC I 类分子, 但 hTERT 特异的 CTL 不能杀伤外周血 CD34⁺ 细胞, 不裂解活化的 T 细胞, 对外周循环的 B 细胞也没有影响。Nair 等^[12] 将鼠 TERT 转入树突状细胞后很容易引起鼠体内 TERT 特异的 CTL 反应, 但对端粒酶阳性的造血组织、肝脏等没有引起自身免疫反应, 小鼠存活良好。这些结果表明, 在体内肿瘤形成过程中, 肿瘤相关抗原 hTERT 特异的 T 细胞既没完全消除, 也没有产生不可逆的耐受。通过适当的手段和途径, hTERT 特异的 T 细胞可以被诱导参与肿瘤的免疫治疗。虽然目前没有关于 hTERT 自体免疫的报道, 但有关 hTERT 在肿瘤病人体内免疫的安全问题仍需进一步观察研究。

4 针对 hTERT 免疫治疗的潜在的问题以及对策

虽然以端粒酶为靶点的免疫治疗具有很多优点, 但也存在一些问题。首先, 约有 10% 左右的人类肿瘤没有端粒酶活性, 其中一部分是依靠非端粒酶依赖机制维持端粒长度, 因此针对端粒酶的肿瘤治疗方案对这些肿瘤或细胞群体不起作用; 其次, 肿瘤抗原提呈途径障碍。如: 在一些肿瘤细胞中发现 HLA-A、-B、-C、 β_2 微球蛋白以及 TAP 等分子的表达下调现象^[16], 影响了抗原的加工和呈递, 增强了免疫逃逸的可能性; 除此以外, 仅通过 MHC-I 类分子呈递 hTERT 抗原肽诱导 CD8⁺ 细胞毒途径的免疫效果不理想。因此, 将 MHC-II 分子限制性的 hTERT 肽段和 MHC-I 分子限制性的抗原肽联合使用, 同时激活 CD4⁺ 和 CD8⁺ 细胞, 可增强抗肿瘤能力, 然而这个方案仅仅限于为数不多的几个 hTERT 肽段和范围比较窄的 MHC 类型。

DNA 疫苗可诱导机体同时产生细胞免疫和体液免疫, 能激发完整的免疫反应产生较强且持久的抗肿瘤效果^[17]。因

此靶向 hTERT 的 DNA 疫苗对表达端粒酶的细胞可能会产生更好的免疫反应。将 hTERT 基因放在细菌质粒 DNA 中的 CMV 启动子的下方,重组的质粒 DNA 通过肌肉注射或者基因枪注射导入抗原提呈细胞或者肌细胞^[18]。细菌质粒中未甲基化的 CpG 岛可以激活 APC,也可以利用 GM-CSF,IL-2 或者其它细胞因子进一步提高免疫反应^[19]。hTERT 可以同其它抗原一样通过内源途径被 APC 提呈,激活 CD8⁺ 细胞裂解肿瘤细胞。也可以经过细胞分泌抗原,被 APC 捕获加工,通过 MHC-II 途径呈递。总之,由于 hTERT 的多肽可以同时被 MHC-I 和 MHC-II 分子呈递,分别激活 CD4⁺ 和 CD8⁺ 细胞,所以 DNA 疫苗可以介导更好的抗端粒酶免疫反应^[20]。

5 hTERT 作为临床肿瘤免疫治疗靶分子的展望

hTERT 是一个近似广泛表达的通用肿瘤相关抗原,可以在体内产生针对肿瘤细胞的细胞毒反应,而对造血器官没有明显的副作用,所以在肿瘤免疫治疗方面端粒酶具有很好的应用前景。

目前在所有肿瘤的治疗方案中,没有一项是可以针对所有肿瘤的,而大于 85% 的肿瘤细胞存在 hTERT 的表达,大于 75% 的人群是 HLA-A2,HLA-A3,HLA-A24 限制性(均已找到相应的抗原肽)。因此,以 hTERT 为免疫原的疫苗是一种广谱肿瘤疫苗,至少可对近 3/4 的肿瘤患者进行 hTERT 特异性免疫治疗。其次,hTERT 的逆转录酶活性对肿瘤细胞的繁殖非常重要,因此肿瘤为逃避免疫监视而下调 hTERT 表达可能会抑制了肿瘤自身的繁殖。最后,hTERT 的广谱性为多种肿瘤的预防和早期治疗提供了预防性治疗策略,尤其是对肿瘤的高危人群。

[参考文献]

- [1] Kipling D, Cooke HJ. Hypervariable ultra-long telomeres in mice [J]. *Nature*, 1990, 347(6291): 400-402.
- [2] Lingner J, Hughes TR, Shevchenko A, *et al.* Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase [J]. *Science*, 1997, 276(5312): 561-567.
- [3] Vonderheide RH, Hahn WC, Schultze JL, *et al.* The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes [J]. *Immunity*, 1999, 10(6): 673-679.
- [4] Vonderheide RH, Schultze JL, Anderson KS, *et al.* Equivalent induction of telomerase-specific cytotoxic T lymphocytes from tumor-bearing patients and healthy individuals [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(23): 8366-8370.
- [5] Vonderheide RH, Anderson KS, Hahn WC, *et al.* Characterization of HLA-A3 restricted cytotoxic T lymphocytes reactive against the widely expressed tumor antigen telomerase [J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(11): 3343-3348.
- [6] Arai J, Yasukawa M, Ohminami H, *et al.* Identification of human telomerase reverse transcriptase-derived peptides that induce HLA-A24-restricted antileukemia cytotoxic T lymphocytes [J]. *Blood*, 2001, 97(9): 2903-2907.
- [7] Schreurs MW, Kueter EW, Scholten KB, *et al.* Identification of a potential human telomerase reverse transcriptase-derived, HLA-A1-restricted cytotoxic T-lymphocyte epitope [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2005, 54(7): 703-712.
- [8] Schroers R, Huang XH, Hammer J, *et al.* Identification of HLA DR7-restricted epitopes from human telomerase reverse transcriptase recognized by CD4⁺ T-helper cells [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(9): 2600-2605.
- [9] Schroers R, Shen L, Rollins L, *et al.* Human telomerase reverse transcriptase-specific T-helper responses induced by promiscuous major histocompatibility complex class II-restricted epitopes [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(13): 4743-4755.
- [10] Ducrest AL, Szutorisz H, Lingner J, *et al.* Regulation of the human telomerase reverse transcriptase gene [J]. *Oncogene*, 2002, 21(4): 541-552.
- [11] Heiser A, Maurice MA, Yancey DR, *et al.* Induction of polyclonal prostrate cancer-specific CTL using dendritic cells transfected with amplified tumor RNA [J]. *J Immunol*, 2001, 166(5): 2953-2960.
- [12] Nair SK, Heiser A, Boczkowski D, *et al.* Induction of cytotoxic T cell responses and tumor immunity against unrelated tumors using telomerase reverse transcriptase RNA transfected dendritic cells [J]. *Nat Med*, 2000, 6(9): 1011-1017.
- [13] Vonderheide RH, Domchek SM, Schultze JL, *et al.* Vaccination of cancer patients against telomerase induces functional antitumor CD8⁺ T lymphocytes [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(3): 828-839.
- [14] Parkhurst MR, Riley JP, Igarash T, *et al.* Immunization of patients with the hTERT: 540-548 peptide induces peptide-reactive T lymphocytes that do not recognize tumors endogenously expressing telomerase [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(6): 4688-4698.
- [15] Su Z, Dannull J, Yang BK, *et al.* Telomerase mRNA-transfected dendritic cells stimulate antigen-specific CD8⁺ and CD4⁺ T cell responses in patients with metastatic prostate cancer [J]. *J Immunol*, 2005, 174(6): 3798-3807.
- [16] Momburg F, Degener T, Bacchus E, *et al.* Loss of HLA-A, B, C and denovo expression of HLA-D in colorectal cancer [J]. *Int J Cancer*, 1986, 37(2): 179-184.
- [17] Robinson HL, Torres CA. DNA vaccines [J]. *Semin Immunol*, 1997, 9(5): 271-283.
- [18] Torres CA, Iwasaki A, Barber BH, *et al.* Differential dependence on target site tissue for gene gun and intramuscular DNA immunizations [J]. *J Immunol*, 1997, 158(10): 4529-4532.
- [19] Klinman DM, Barnhart KM, Conover J. CpG motifs as immune adjuvants [J]. *Vaccine*, 1999, 17(1): 19-25.
- [20] Chow YH, Chiang BL, Lee YL, *et al.* Development of Th1 and Th2 populations and the nature of immune responses to hepatitis B virus DNA vaccines can be modulated by codelivery of various cytokine genes [J]. *J Immunol*, 1998, 160(3): 1320-1329.

[收稿日期] 2005 - 08 - 25

[修回日期] 2005 - 10 - 28

[本文编辑] 韩丹